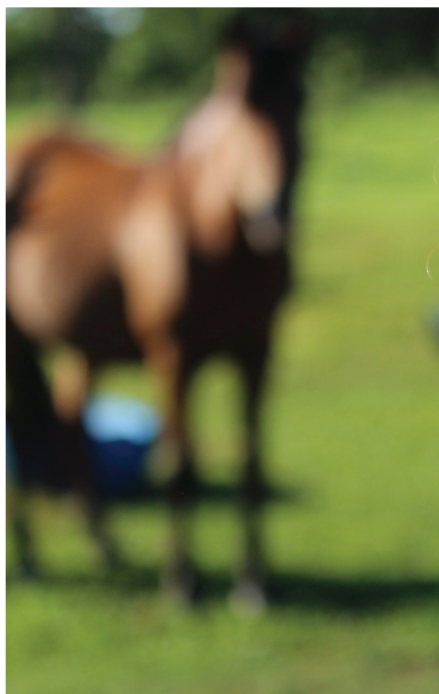


Caracterização e identificação de *Burkholderia mallei* por espectrometria de massas MALDI-TOF: resultados de um estudo pilot



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Corte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
47**

Caracterização e identificação de *Burkholderia mallei* por espectrometria de massas MALDI-TOF: resultados de um estudo piloto

*Newton Valério Verbisck
Flávio Ribeiro de Araújo
Emanuelle Baldo Gaspar
Antônio Augusto Fonseca Júnior
Rinaldo Aparecido Mota
Karla Patrícia Chaves da Silva
Lais Cristina Oliveira Alvarenga
Daiane Aparecida Rosa Lima*

**Embrapa Gado de Corte
Campo Grande, MS
2020**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte

Av. Rádio Maia, 830, Zona Rural, Campo Grande, MS,
79106-550, Campo Grande, MS
Fone: (67) 3368 2000
Fax: (67) 3368 2150
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Gado de Corte

Presidente
Gilberto Romeiro de Oliveira Menezes

Secretário-Executivo
Rodrigo Carvalho Alva

Membros
Alexandre Romeiro de Araújo, Davi José
Bungenstab, Fabiane Siqueira, Gilberto
Romeiro de Oliveira Menezes, Marcelo Castro
Pereira, Mariane de Mendonça Vilela, Marta
Pereira da Silva, Mateus Figueiredo Santos,
Vanessa Felipe de Souza

Supervisão editorial
Rodrigo Carvalho Alva

Revisão de texto
Rodrigo Carvalho Alva

Tratamento das ilustrações
Rodrigo Carvalho Alva

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Rodrigo Carvalho Alva

Foto da capa
Rodrigo Carvalho Alva

1ª edição
Publicação digitalizada (2020)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Nome da unidade catalogadora

Caracterização e identificação de *Burkholderia mallei* por espectrometria de massas
MALD-TOF: resultados de um estudo piloto / Newton Valério Verbick ... [et al.]. -
Campo Grande, MS : Embrapa Gado de Corte, 2020.
PDF (26 p.). – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Gado de Corte,
ISSN 1983-9715 ; 47).

1. Análise química. 2. *Mycobacterium bovis*. 3. PCR. 4. Tuberculose. 5. Veado.
6. Zoonose. I. Verbick, Newton Valério. II. Araújo, Flávio Ribeiro de. III. Gaspar,
Emanuelle Baldo. IV. Fonseca Júnior, Antônio Augusto. V. Mota, Rinaldo Aparecido.
VI. Silva, Karla Patrícia Chaves da. VII. Alvarenga, Lais Cristina Oliveira. VIII. Lima,
Daiane Aparecida Rosa. IX. Série.

CDD 636.208969

Sumário

Introdução.....	8
Objetivos.....	10
Objetivo geral	10
Objetivos específicos.....	10
Metodologia	10
Isolados	10
Cultivo.....	11
Caracterização genética.....	11
Espectrometria de massas MALDI-TOF.....	12
Identificação por MALDI Biotyper™	13
Classificação por ClinProTools™	14
Resultados e discussão.....	14
Conclusão.....	22
Referências	22

Caracterização e identificação de *Burkholderia mallei* por espectrometria de massas MALDI-TOF: resultados de um estudo piloto

Newton Valério Verbisck¹

Flávio Ribeiro de Araújo²

Emanuelle Baldo Gaspar³

Antônio Augusto Fonseca Júnior⁴

Rinaldo Aparecido Mota⁵

Karla Patrícia Chaves da Silva⁶

Lais Cristina Oliveira Alvarenga⁷

Daiane Aparecida Rosa Lima⁸

Resumo – Mormo é uma doença infecciosa causada pela bactéria Gram-negativa e imóvel *Burkholderia mallei*, que afeta principalmente cavalos, burros e mulas, podendo também ser eventualmente transmitida a outros animais e humanos. Embora esta doença tenha sido erradicada na maioria dos países, tem atualmente o status de doença reemergente por causa dos numerosos surtos recentemente relatados. Devido ao impacto econômico e zoonótico da infecção por *B. mallei* e a falta de terapia eficaz, o mormo é

¹ Biomédico, Doutor em Microbiologia e Imunologia, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS.

² Médico-veterinário, doutor em Imunologia, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS.

³ Médica-veterinária, doutora em Imunologia, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS.

⁴ Farmacêutico, doutor em Ciência Animal, fiscal federal agropecuário do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais.

⁵ Médico-veterinário, Doutor em Ciências Veterinárias, professor titular na Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE.

⁶ Médica-veterinária, Doutora em Medicina Veterinária, professora na Universidade Federal de Alagoas, Viçosa, AL.

⁷ Médica-veterinária, Mestre em Ciências Veterinárias, Doutoranda em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

⁸ Médica-veterinária, Mestranda em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

reconhecido como doença notificável em muitos países. A espectrometria de massas com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador por tempo-de-vôo (MALDI-TOF) é uma tecnologia eficaz para identificação de isolados bacterianos em laboratórios de diagnóstico clínico, sendo considerado um método confiável, rápido e econômico. Neste estudo piloto estabeleceu-se a metodologia MALDI-TOF para identificação confiável de *B. mallei* e sua distinção de outras espécies do gênero *Burkholderia*, tais como *B. pseudomallei*. Foram analisados isolados de *B. mallei* (n=5) e de *B. pseudomallei* (n=2), obtidos de casos clínicos no Brasil. Os isolados foram submetidos a PCR e provas fenotípicas para caracterização da espécie, confirmada por PCR em tempo real (qPCR), e os espectros de massas de referência de *B. pseudomallei* e de *B. mallei* foram gerados. A separação de espécies de *Burkholderia* foi bem-sucedida e a acurácia de identificação dos isolados clínicos de *B. mallei* foi de 80% após análise com o programa computacional MALDI Biotyper™ (Bruker Daltonics). Além disso, observamos que dois sinais de massa/carga permitiram, com o programa computacional ClinProTools™ (Bruker Daltonics), a classificação correta de 100% dos isolados clínicos de *B. mallei*. Conclui-se que MALDI-TOF permite a identificação confiável de *Burkholderia mallei* após cultivo microbiológico, sendo que esta metodologia poderá ser futuramente validada para diagnóstico com a análise de um número maior de amostras..

Termos para indexação: *Burkholderia mallei*, MALDI-TOF, mormo, equino.

Abstract – *Glanders is an infectious disease caused by the Gram-negative, nonmotile bacterium Burkholderia mallei, mainly affecting horses, donkeys and mules, and which, possibly, may also be transmitted to other animals and humans. Although this disease has been eradicated in most countries, it has now a status of reemerging disease, because of the numerous outbreaks recently reported. Due to the economic and zoonotic impact of B. mallei infection and the lack of effective therapy, glanders is recognised as a notifiable disease in many countries. Matrix-assisted laser desorption ionization and time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) is an effective technology for identification of bacterial isolates in clinical diagnostic laboratories, being considered a*

reliable, fast and cost-effective method. In this pilot study we established the MALDI-TOF methodology to achieve reliable identification of B. mallei and its differentiation from other Burkholderia species, as B. pseudomallei. B. mallei (n=5) and B. pseudomallei (n=2) isolates from Brazilian clinical cases were analyzed. The isolates were submitted to PCR and phenotypic tests to characterize the species, which was confirmed by real-time PCR (qPCR), and B. pseudomallei and B. mallei reference mass spectra were generated. Burkholderia species separation was successful and identification accuracy of 80% was achieved with MALDI Biotyper™ (Bruker Daltonics) software. Furthermore, we observed that two mass/charge signals allowed, by the use of the ClinProTools™ (Bruker Daltonics) software, correct classification for 100% of the B. mallei clinical isolates. It is concluded that MALDI-TOF allows a reliable identification for Burkholderia mallei after microbiological culture, and in the future such methodology might be validated for diagnosis after a higher sample number analysis..

Index terms: *Burkholderia mallei, MALDI-TOF, glanders, equine.*

Introdução

O mormo é uma doença contagiosa e zoonótica de grande importância para a equideocultura. Esta enfermidade é causada por *Burkholderia mallei*, bactéria Gram-negativa, imóvel e intracelular facultativa, que afeta principalmente os solípedes, particularmente cavalos, burros e mulas (KETTLE, WERNERY, 2016; PAL et al., 2018).

Frequentemente o mormo é manifestado como doença crônica progressiva lenta em cavalos; no entanto, em burros e mulas a doença é de natureza aguda. Esta enfermidade afeta o trato respiratório superior e os pulmões de equinos, que desenvolvem granulomas e úlceras. Outros sintomas incluem secreção nasal purulenta, pneumonia e condições gerais precárias. A forma cutânea é caracterizada por gânglios linfáticos regionais alargados e endurecidos que podem se romper e supurar (OIE, 2015).

Embora o mormo seja uma doença essencialmente de equídeos, os seres humanos e outros animais como camelos, cabras, cães, gatos, ursos e felinos em zoológicos, podem ocasionalmente ser infectados com *B. mallei*, por meio do contato direto com tecidos ou secreções de animais infectados (CDC, 2012).

O mormo em seres humanos é primariamente uma doença ocupacional. Casos esporádicos têm sido observados em veterinários, tratadores de animais, técnicos de laboratório (CDC, 2012). Devido à natureza grave da doença e à falta de opções de tratamento, combinado com o potencial para formação de aerossóis do microrganismo, *B. mallei* é considerada um membro da lista de prioridades de agentes de categoria B do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (ROTZ et al., 2002), que dá origem à aplicação de medidas sanitárias exclusivas, como o abate de todos os animais positivos. Movimentação internacional de cavalos e comércio (seja para criação, de corrida, equitação ou lazer) também está sujeita a estas condições. Nesses casos, o status de livre de mormo deve ser certificado. Vale a pena mencionar ainda que o mormo foi utilizado como arma biológica contra a cavalaria na Guerra Civil Americana, Primeira Guerra Mundial e na Segunda Guerra Mundial (SHARRER et al., 1995). Cabe destacar que nenhuma vacina humana ou veterinária está disponível.

A doença foi erradicada com êxito da Europa, América do Norte e Austrália durante a primeira metade do século 20, por meio de teste sorológico (ou maleinização) e abate maciço de animais infectados (DERBYSHIRE, 2002). Hoje, a sua prevalência em todo o mundo foi consideravelmente reduzida, mas a doença ainda é endêmica na África, Ásia, Oriente Médio e América Latina, incluindo o Brasil. É preocupante, no entanto, que mormo tenha recuperado o status de uma doença reemergente nas últimas duas décadas, como o ressurgimento de focos em um número crescente de países: Brasil (2005 - 2010, 2012 - 2013), Turquia, Irã (2007- 2010), Iraque, Paquistão (2010), Índia (2006 - 2011), Mongólia (2005, 2007 - 2010), EAU (2004), Bahrain (2010), Kuwait (2009 - 2010), Líbano (2011), Síria, Myanmar (2009 - 2010), Filipinas (2006 - 2007), Rússia (2007), Afeganistão (2009, 2011) (ALANI *et al.*, 1998; ARUN *et al.*, 1999; BAZARGANI *et al.*, 1996; ODONTSETSEG *et al.*, 2005; SCHOLZ *et al.*, 2006; ELSCHNER *et al.*, 2009; HORNSTRA *et al.*, 2009; MALIK *et al.*, 2009; NAUREEN *et al.*, 2007; MOTA *et al.*, 2010; WAHID; 2010; WERNERY *et al.*, 2011).

Desde a descrição da reemergência do mormo no Brasil em 1999 (MOTA *et al.*, 2000), a doença vem sendo notificada de forma progressiva nas diversas unidades federativas. A partir disto, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento instituiu Diretrizes Gerais para Prevenção, Controle e Erradicação do Mormo no Território Nacional, no âmbito do Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos, na forma de Instrução Normativa (BRASIL, 2018). O programa possui estratégias como: educação sanitária; estudos epidemiológicos; fiscalização e controle do trânsito de equídeos; cadastramento, fiscalização e certificação sanitária de estabelecimentos; e intervenção imediata quando a suspeita ou ocorrência de doença de notificação obrigatória (IAGRO, 2020). Com tudo, a busca por alternativas rápidas e eficazes para o diagnóstico constitui uma possibilidade a ser considerada no âmbito de pesquisa e desenvolvimento.

Recentemente, a espectrometria de massas com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de massas do tipo tempo-de-voo (MALDI-TOF) tem sido utilizada como ferramenta de pesquisa na detecção e identificação de vários isolados bacterianos (CLARK *et al.*, 2013). A técnica permite a comparação entre espectros de massas de um microrganismo isolado com aqueles disponíveis em uma base de dados de referência, composta por espectros de massas de cepas conhecidas, pos-

sibilitando a classificação e identificação do patógeno com mais rapidez do que os métodos convencionais (PATEL, 2015). A velocidade, a robustez e os custos de preparação e medição de amostras tornam esta técnica excepcionalmente adequada para uso rotineiro e de alto rendimento (CROXATTO *et al.*, 2012). Postulou-se então que a análise por espectrometria de massas MALDI-TOF poderia permitir a identificação correta de isolados de *B. mallei*, pela distinção de possíveis contaminações com outras bactérias do mesmo gênero.

Desta maneira, esse estudo piloto teve como objetivo caracterizar, por análise de perfis moleculares obtidos por espectrometria de massas MALDI-TOF, amostras de *B. mallei* isoladas por órgãos veterinários oficiais.

Objetivos

Objetivo geral

Caracterizar isolados clínicos de *Burkholderia mallei*, obtidos no Brasil, por espectrometria de massas MALDI-TOF.

Objetivos específicos

- i) Obter espectros de massas de referência para as espécies *B. mallei* e *B. pseudomallei* e caracterizá-los frente a espectros de massas de referência já disponíveis em base de dados ou na literatura;
- ii) Realizar a identificação confiável em nível de espécie de isolados clínicos de *B. mallei* por espectrometria de massas MALDI-TOF.

Metodologia

Isolados

Foram analisados 5 isolados de *B. mallei* (010, 017, 176, Flash e Orelhinha), obtidos de casos clínicos dos estados de Pernambuco

e Alagoas, no ano de 2000. O isolamento destas amostras foi realizado pelo Dr. Rinaldo Aparecido Mota, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, o qual cedeu os isolados ao Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA)/MG. A cepa ATCC 15310 de *B. mallei* foi utilizada como referência.

Dois isolados clínicos de *B. pseudomallei* (835 e 2356) também foram incluídos neste estudo, ambas cedidas ao LFDA/MG pela Dra. Iracema de Aguiar Patrício, do LACEN-CE. O isolado 835 foi obtido de um caso clínico de melioidose e o isolado 2356 foi obtido de solo.

Cultivo

As amostras foram semeadas em ágar sangue e incubadas em estufa a 37°C por 48 horas. As colônias (pequenas, translúcidas, não hemolíticas e de coloração ligeiramente cinzenta) foram coletadas e submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação das espécies. Em seguida, as amostras foram liofilizadas.

Todas as amostras foram submetidas às provas fenotípicas para caracterização da espécie: Gram, prova da catalase, prova da oxidase, prova de motilidade.

Caracterização genética

Os isolados clínicos foram confirmados por PCR em tempo real (qPCR), que consiste na amplificação de um fragmento de DNA, conforme descrito por Tomaso e cols. (2006) e Janse e cols. (2013).

Além disso, os isolados foram testados por qPCR padronizada pelo LFDA/MG, para o gene de uma proteína hipotética presente no cromossomo 1. O sequenciamento parcial dos genes *narK* e *lysR* e da proteína hipotética confirmaram a identidade das amostras de *B. mallei*. Para tanto, os iniciadores utilizados para a amplificação dos genes foram selecionados conforme descrito abaixo no Quadro 1.

Quadro 1. Iniciadores usados para identificação molecular de *Burkholderia mallei*.

Iniciador	Sequência 5'→3'
Nark.F	CTACTCGTGCCTGGGAT
Nark.R	GACGATGACGGCACCCAC
Burk.LyrsR.475.F	AATTGGTCGCCGTGATAGAC
Burk.LyrsR.475.R	TCGGCTCGATGGAAAGTAAC
Burk.hypot.457.F	TGTTGACGACGCCTACCATA
Burk.hypot.457.R	TGCTGCACCTTTGACCTGTA
Burk.Bm17.F	TATACGCGAGGTTATAACGGATG
Burk.Bm17.R	CTTTCTGCTTTTCTAACGTTTCC

Espectrometria de massas MALDI-TOF

As amostras bacterianas foram inativadas com etanol no LFDA/MG, conforme descrito por Sauer e cols. (2008), conforme protocolo universalmente utilizado e consagrado para análise de bactérias Gram positivas e Gram negativas (DREVINEK et al., 2012). Após coleta de 200 µL do caldo de cultura, foram realizadas duas lavagens com água tipo I (Milli-Q) estéril por centrifugação a 16.000 g durante 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi cuidadosamente misturado em 300 µL de água para ressuspensão completa das bactérias, que em seguida foram inativadas com a adição de 900 µL de etanol absoluto. A inativação foi confirmada por semeadura em ágar nutriente glicerinado.

A extração foi realizada no laboratório de Proteômica e Espectrometria de Massas da Embrapa Gado de Corte, de acordo com o protocolo estabelecido por Freiwald e Sauer (2009). A solução etanólica contendo as bactérias inativadas foi centrifugada a 16.000 g durante 2 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o conteúdo celular foi extraído a partir do sedimento utilizando-se quantidades iguais de ácido fórmico a 70% (v/v) e acetonitrila pura. Após nova centrifugação a 16.000 g durante 2 minutos, aplicou-se 1 µL do sobrenadante em cada poço de uma placa de aço para MALDI-TOF, deixando-se secar ao ar ambiente. Os poços foram cobertos com 1 µL de ácido α-ciano-

4-hidroxi-cinâmico (5 mg/mL) em solução contendo 50% de acetonitrila (v/v) e 2,5% de ácido trifluoracético (v/v). Após secar, a mistura cristalizada foi analisada utilizando-se um espectrômetro de massas Autoflex III Smartbeam (Bruker Daltonics).

A aquisição e análise dos espectros de massas das amostras foram realizadas conforme descrito por Bier e cols. (2017), no laboratório de Proteômica e Espectrometria de Massas da Embrapa Gado de Corte. Os espectros de massas foram adquiridos em um espectrômetro de massas Autoflex Smartbeam III (Bruker Daltonics), com modo linear positivo e razão de massa/carga (m/z) entre 2.000 e 20.000 Daltons. Os parâmetros de aquisição foram tensão da fonte IS1 20 kV, tensão da fonte IS2 de 18,55 kV, tensão de lentes 8,80 kV e tempo de retardo de extração de íons de 240 ns. Dez espectros de posições diferentes de cada amostra foram somados após a calibração externa com a mistura de calibrantes padrão para bactérias BTS (Bruker Daltonics).

Identificação por MALDI Biotyper™

Os espectros obtidos foram processados utilizando-se o programa computacional MALDI Biotyper™ v.3.1 (Bruker Daltonics), com as configurações padrão. Os espectros de massas dos isolados clínicos, contendo as razões m/z e suas intensidades, foram comparados diretamente com a biblioteca de espectros de referência ou MSPs (do inglês *Main Spectra Profiles*), de modo a permitir a identificação bacteriana por meio do algoritmo computacional denominado Biotyper™. A biblioteca de referência utilizada neste estudo foi a MBT Compass Library DB-7311 (banco de dados v.7.0.0.0), de Fevereiro de 2017 (BRUKER DALTONICS, 2018), com 7.311 MSPs para 434 gêneros e 2509 espécies de bactérias, leveduras e fungos, incluindo-se as de 30 espécies diferentes do gênero *Burkholderia*. Os resultados de identificação com Biotyper™ foram gerados após a inclusão dos espectros de referência de *B. mallei* e *B. pseudomallei*, obtidos a partir do processamento de 20 espectros (réplicas) de cada amostra utilizada como referência. A lista de 70 sinais m/z com frequência maior do que 50% foi utilizada para a geração dos MSPs, que representam o espectro consenso para uma determinada amostra assumida como referência. Para a identificação dos microrganismos por MALDI Biotyper™, o algoritmo atribui os seguintes valores de escore: de 2,300 a

3,000, para identificação confiável de espécie; de 2,000 a 2,299, para identificação confiável de gênero e provável identificação de espécie; de 1,700 a 1,999, para provável identificação de gênero; menor do que 1,700, em que não há identificação confiável de gênero ou espécie. Os dendrogramas foram produzidos utilizando-se os parâmetros padrão do programa, com a medida de distância determinada por correlação, ligação do tipo completa, não orientada por escore. Como grupo externo nas análises de dendrograma foi utilizado o MSP de *Lautropia mirabilis* presente na biblioteca de referência da Bruker, por representar outro gênero da família *Burkholderiaceae* e poder servir como controle.

Classificação por ClinProTools™

O programa computacional ClinProTools™ v.3.0 (Bruker Daltonics) é uma ferramenta de bioinformática que permite incluir análise estatística comparativa dos perfis de massas MALDI-TOF. Com essa ferramenta é possível descobrir biomarcadores, classificar amostras e realizar validação em grandes conjuntos de dados, com análise estatística univariada e multivariada, em abordagem supervisionada ou não supervisionada (inteligência artificial). Esse programa foi utilizado para calcular a variância dos sinais m/z dos conjuntos de 20 espectros adquiridos para os isolados *B. pseudomallei* 835, *B. pseudomallei* 2356 e cepa de referência *B. mallei* ATCC 15310, de modo a identificar biomarcadores, neste caso sinais m/z , capazes de classificar corretamente os isolados clínicos de *B. mallei* e *B. pseudomallei*.

O programa processa os espectros de modo semelhante ao MALDI-Biotyper™, identificando os sinais m/z , sendo o parâmetro mais importante o valor de sinal/ruído, que neste estudo foi de valor 2. Adicionalmente são calculados os valores de média e desvio padrão da intensidade de cada sinal, considerando o número de espectros de cada grupo amostral. Em seguida podem ser identificados os sinais m/z que apresentem poder de separação e, conseqüentemente, discriminação entre as espécies, nesse caso *B. pseudomallei* e *B. mallei*. Por fim, os sinais discriminatórios foram utilizados para classificar os isolados clínicos de *B. mallei*, em análise supervisionada com o algoritmo QuickClassifier e o teste estatístico Wilcoxon/Kruskal-Wallis.

Resultados e discussão

A espectrometria de massas MALDI-TOF vem sendo utilizada com êxito na identificação de espécies bacterianas (CLARK et al. 2013). Os espectros de massas gerados fornecem um perfil proteômico do microrganismo desconhecido, sendo único para cada espécie de microrganismo, podendo inclusive diferenciar picos específicos para gêneros e espécies (ANGELETTI, 2016). Tornou-se para os laboratórios clínicos uma nova ferramenta em potencial para identificar organismos de maneira rápida, precisa e econômica. No entanto, essa tecnologia também apresenta novos desafios, uma vez que organismos altamente patogênicos podem apresentar riscos para a equipe do laboratório durante a preparação e teste de amostras. A validação de sistemas de identificação também representa um desafio, pois o acesso a muitos organismos altamente patogênicos é regulado pelo *Select Agent Program* e, portanto, esses agentes não estão disponíveis para laboratórios clínicos avaliarem as limitações das bibliotecas de *software* (RUDRIK et al., 2017).

Quando os espectros gerados para uma amostra ou isolado específico não são identificados na biblioteca existente, pode-se gerar espectros de referência, os denominados MSP, e incluí-los ao banco de dados, contanto que o operador responsável forneça ao sistema informações corretas quanto à origem e referência daquele microrganismo em questão (BIER et al., 2017).

No caso das espécies *B. mallei* e *B. pseudomallei*, os espectros de referência não estão disponíveis comercialmente, uma vez que são consideradas armas biológicas (LASCH et al., 2015; RUDRIK et al., 2017; BRUKER DALTONICS, 2018). Diante disso, neste estudo, fez-se necessário inicialmente obter os espectros de massas de referência de *B. pseudomallei* e *B. mallei*, empregando-se as três amostras previamente identificadas por qPCR no LFDA/MG. Essa abordagem já havia sido realizada na Embrapa Gado de Corte para a identificação de isolados de *Mycobacterium bovis*, pois as bibliotecas utilizadas não possuíam anotações para diferenciar as espécies do Complexo *Mycobacterium Tuberculosis* (BACANELLI et al., 2019).

Após o processamento dos espectros de massas das cepas de referência *B. mallei* e *B. pseudomallei* pelo programa computacional MALDI Biotyper™, verificaram-se diferenças de sinais (*m/z* e intensidade) que possibilitaram a separação daquelas duas espécies de *Burkholderia*, indicando que estas

possuem de fato perfis moleculares distintos. Conforme apresentado no dendrograma da Figura 1, é possível observar a distância relativa existente entre os perfis de espectros principais (MSP) de *B. pseudomallei* (835 e 2356) e *B. mallei* (ATCC 15310). Além disso, os MSPs obtidos também permitiram a distinção frente a outras 30 espécies do gênero *Burkholderia*, disponíveis na biblioteca de espectros de massas de referência da Bruker Daltonics e incluídos na análise (Figura 1). Estes resultados indicam que os espectros de massas aqui obtidos podem ser utilizados para a identificação de *B. mallei*, por meio de espectrometria de massas MALDI-TOF, conforme já descrito na literatura (DREVINEK *et al.*, 2012; KARGER *et al.*, 2012; LASCH *et al.*, 2015; SUTTISUNHAKUL *et al.*, 2017; RUDRIK *et al.*, 2017). É interessante notar que os MSP de *B. pseudomallei* e *B. mallei* obtidos neste estudo ficaram associados no mesmo grupo que o MSP

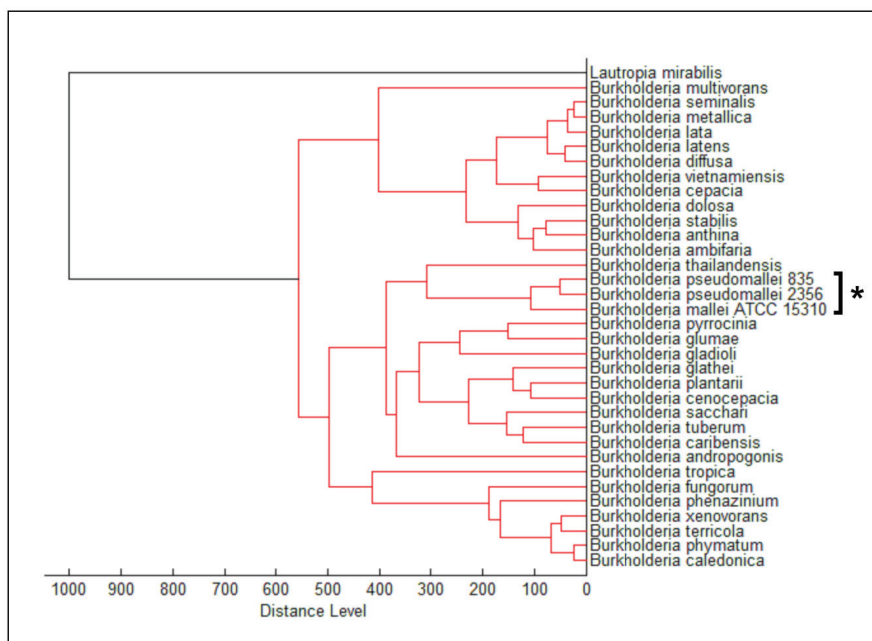


Figura 1. Dendrograma com os MSP de *Burkholderia pseudomallei* e *Burkholderia mallei* frente aos MSP do gênero *Burkholderia* da biblioteca Biotyper™. Os espectros consenso (MSP), gerados a partir de 20 réplicas, dos isolados clínicos 835 e 2356 de *B. pseudomallei* e da cepa referência ATCC 15310 de *B. mallei* (indicados com asterisco) foram comparados com os MSP referência para 30 espécies de *Burkholderia* da biblioteca MBT Compass Library DB-7311. O MSP de *Lautropia mirabilis*, representando outro gênero da família *Burkholderiaceae*, foi utilizado como grupo externo.

de *B. thailandensis* da biblioteca da Bruker Daltonics (Figura 1), o que era de se esperar uma vez que essas três espécies são as que compõem o denominado Complexo Pseudomallei (KARGER *et al.*, 2012; SUTTISUNHAKUL *et al.*, 2017).

Posteriormente, realizou-se a identificação dos 5 isolados clínicos disponibilizados pelo LFDA/MG para este estudo, utilizando-se o programa MALDI Biotyper™. Dos 5 isolados clínicos analisados, quatro foram identificados como *B. mallei*, com exceção do isolado denominado Fla (amostra Flash), que foi identificado como *B. pseudomallei* (Tabela 1). De um modo geral, os escores de identificação obtidos pelo algoritmo Biotyper™ para os 5 isolados clínicos ficaram próximos de 2,000, o que, de acordo com os escores preconizados para a identificação de bactérias com o algoritmo Biotyper™, possibilita apenas assegurar a identificação no nível de gênero, no caso *Burkholderia*, e indicar a espécie mais provável. Segundo Croxatto e cols. (2012), escores relativamente baixos podem estar relacionados com baixa quantidade de células, contaminação por meio de cultura ou protocolo de extração proteica não otimizado, fatores esses que influenciam na qualidade dos espectros. Nestes casos, a recomendação é recultivar os isolados e refazer os espectros de massas

Tabela 1. Identificação dos isolados de *Burkholderia mallei* com MALDI Biotyper™.

Amostra	Réplica	Identificação	Escore
010	1	<i>B. mallei</i>	2,087
	2	<i>B. mallei</i>	2,067
	3	<i>B. mallei</i>	2,029
017	1	<i>B. mallei</i>	1,980
	2	<i>B. mallei</i>	1,982
	3	<i>B. mallei</i>	1,906
176	1	<i>B. mallei</i>	2,129
	2	<i>B. mallei</i>	2,124
	3	<i>B. mallei</i>	2,176
Ore	1	<i>B. mallei</i>	2,223
	2	<i>B. mallei</i>	2,049
	3	<i>B. mallei</i>	2,213
Fla	1	<i>B. pseudomallei</i>	1,977
	2	<i>B. pseudomallei</i>	2,068
	3	<i>B. pseudomallei</i>	1,957

MALDI-TOF, revendo o protocolo, de modo a obter escores de identificação mais altos. Entretanto, se desconsiderarmos o limite 2,000 da Bruker Daltonics, observamos que os resultados da Tabela 1 apontam para 80% de acurácia de identificação, o que está em linha com o descrito na literatura, entre 75 e 90%, considerando-se a abordagem utilizada neste estudo (LASCH et al., 2015).

Em uma análise adicional por dendrograma, realizada ainda com o programa MALDI Biotyper™, comparou-se a semelhança dos 5 isolados clínicos *B. mallei* frente aos MSPs de referência de *B. pseudomallei* (amostras 835 e 2356), *B. mallei* (ATCC 15310) e *B. thailandensis* (MSP da biblioteca MBT Compass Library DB-7311, da Bruker Daltonics), sendo essas as três espécies de *Burkholderia* que compõem o Complexo Pseudomallei (Figura 2). Os três espectros de massas obtidos para cada isolado clínico, identificados na Tabela 1, foram utilizados para gerar 5 espectros consenso, ou seja, um MSP para cada isolado clínico de *B. mallei*, e estes foram comparados aos MSPs de *B. pseudomallei*, *B. mallei* e *B. thailandensis* indicados acima. Foi possível observar o agrupamento dos MSPs dos 5 isolados clínicos de *B. mallei* com o MSP de *B. mallei* ATCC 15310, sugerindo maiores semelhanças com *B. mallei* do que com *B. pseudomallei* (Figura 2). O mesmo resultado foi obtido quando o dendrograma foi produzido incluindo-se os MSPs das 30 espécies de *Burkholderia* presentes na biblioteca de espectros de referência da Bruker Daltonics (dados não mostrados). Ainda relativamente ao resultado apresentado na Figura 2, foi possível verificar que o MSP do isolado clínico Fla, anteriormente identificado como *B. pseudomallei* (Tabela 1), mostrou-se mais semelhante a *B. mallei* (Figura 2), conforme seria de se esperar. A explicação para isto é que na identificação apresentada na Tabela 1, o Biotyper™ analisa individualmente cada um dos espectros de massas, ao passo que ao gerar os MSPs, neste caso com os três espectros de massas disponíveis, são considerados os sinais *m/z* de maior frequência para compor o consenso, o que corrige eventuais discrepâncias entre isolados muito semelhantes. Assim, para aumentar a acurácia da identificação de espécie, utilizando-se exclusivamente o programa MALDI Biotyper™, uma possível estratégia é gerar os MSP de referência de *B. mallei* e *B. pseudomallei* com um número maior de cepas, isoladas preferencialmente no Brasil, com um número mínimo de 20 espectros de massas por isolado, conforme descrito em trabalho anterior do nosso grupo (BACANELLI et al., 2019).

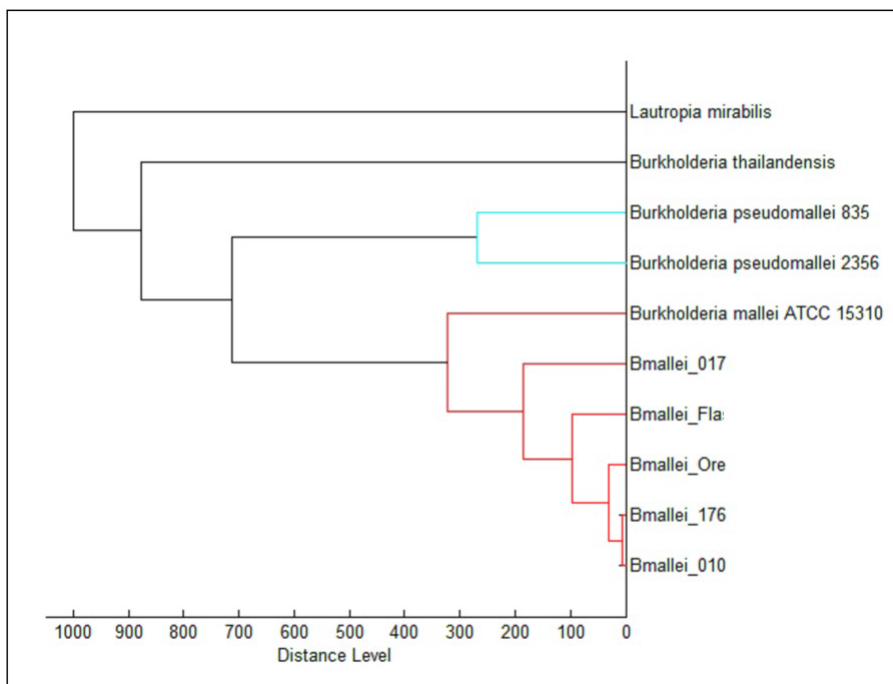


Figura 2. Dendrograma com os MSP dos isolados de *Burkholderia mallei* frente aos MSP das espécies do Complexo Pseudomallei. Os espectros consenso (MSP), gerados a partir de três réplicas, dos isolados clínicos 010, 017, 176, Flash (Fla) e Orelhinha (Ore) de *B. mallei* foram comparados com os MSP de *B. pseudomallei* (835 e 2356), de *B. mallei* (ATCC 15310), obtidos neste estudo, e com o MSP de *B. thailandensis*, da biblioteca MBT Compass Library DB-7311. O MSP de *Lautropia mirabilis*, representando outro gênero da família *Burkholderiaceae*, foi utilizado como grupo externo.

O programa MALDI Biotyper™ computa os escores de identificação, ao comparar os valores de m/z e intensidade de todos os sinais identificados no espectro teste frente aos valores de m/z e intensidade desses mesmos sinais quando presentes nos espectros de referência (MSPs), sem considerar, contudo, a variância daqueles valores. Assim, de modo a realizar um tratamento mais acurado dos dados e permitir a classificação dos isolados com maior confiabilidade, o programa computacional ClinProTools™ (Bruker Daltonics) foi utilizado, uma vez que inclui avaliação estatística dos dados,

e é normalmente citado na literatura como complementar à identificação por MALDI Biotyper™ de espécies bacterianas muito semelhantes (HSUEH *et al.*, 2014; MATSUMURA *et al.*, 2014; MÅNSSON *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2015; HUANG, HUANG, 2018).

Ao analisar os espectros de massas dos dois isolados clínicos de *B. pseudomallei* e da cepa de referência *B. mallei* com o programa ClinProTools™ foi possível identificar dois componentes moleculares

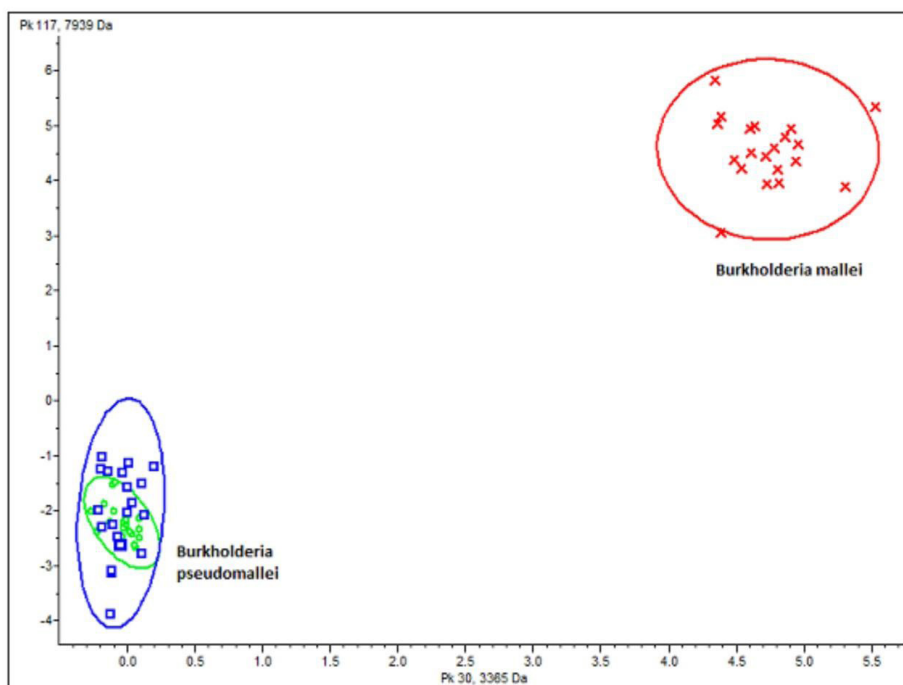


Figura 3. Discriminação dos isolados de *Burkholderia pseudomallei* e da cepa de referência de *Burkholderia mallei* com o programa computacional ClinProTools™. O gráfico apresenta a distribuição bidimensional dos sinais m/z 3365 e 7939 que, conforme o valor-p estatístico, ao mesmo tempo agrupam os dois isolados de *B. pseudomallei* (835 em verde e 2356 em azul) e os separam da referência *B. mallei* (vermelho). Estão apresentados os valores de área dos picos calculados para os 20 espectros de massas de cada isolado, com as elipses representando o intervalo de confiança 95% de cada grupo.

(m/z 3365 e 7939), que melhor descrevem a semelhança entre as amostras de *B. pseudomallei* e, ao mesmo tempo, as distinguem de *B. mallei* (Figura 3). Esse resultado demonstra ainda que, embora os isolados clínicos de *B. pseudomallei* tenham perfis de massas relativamente distintos, é possível identificar sinais m/z com intensidades que permitem sua classificação na mesma espécie, conforme seria esperado.

Por outro lado, quando os espectros dos 5 isolados clínicos de *B. mallei* são avaliados frente aos 2 de *B. pseudomallei* e da cepa de referência *B. mallei* (ATCC 15310) com ClinProTools™, observamos que dois componentes moleculares (m/z 4719 e 19892) permitiram classificar corretamente os isolados clínicos de *B. mallei* (Figura 4). Os isolados clínicos 017, Fla e Ore apresentaram intensidade do sinal m/z 4719 fora do intervalo de confiança 95% da cepa de referência *B. mallei*, entretanto sem comprometer a classificação correta pelo algoritmo QuikClassifier utilizado nesta análise estatística. Esse resultado sugere que a variabilidade dos isolados de *B. mallei* analisados neste estudo é maior do que a da cepa de referência ATCC 15310, pelo menos para o m/z 4719, o que está de acordo com os resultados anteriores aqui apresentados. Por sua vez, a variabilidade dos isolados clínicos de *B. mallei* foi menor do que a dos isolados de *B. pseudomallei*, considerando os m/z mostrados na Figura 4.

De fato, em análise de componente principal feita com ClinProTools™, Karger e cols. (2012) observaram maior diversidade nos isolados de *B. pseudomallei*, enquanto os isolados de *B. mallei* formavam um grupo relativamente mais homogêneo. No entanto, os sinais m/z descritos por aqueles autores como capazes de separar as duas espécies são diferentes dos que observamos neste estudo (KARGER *et al.*, 2012).

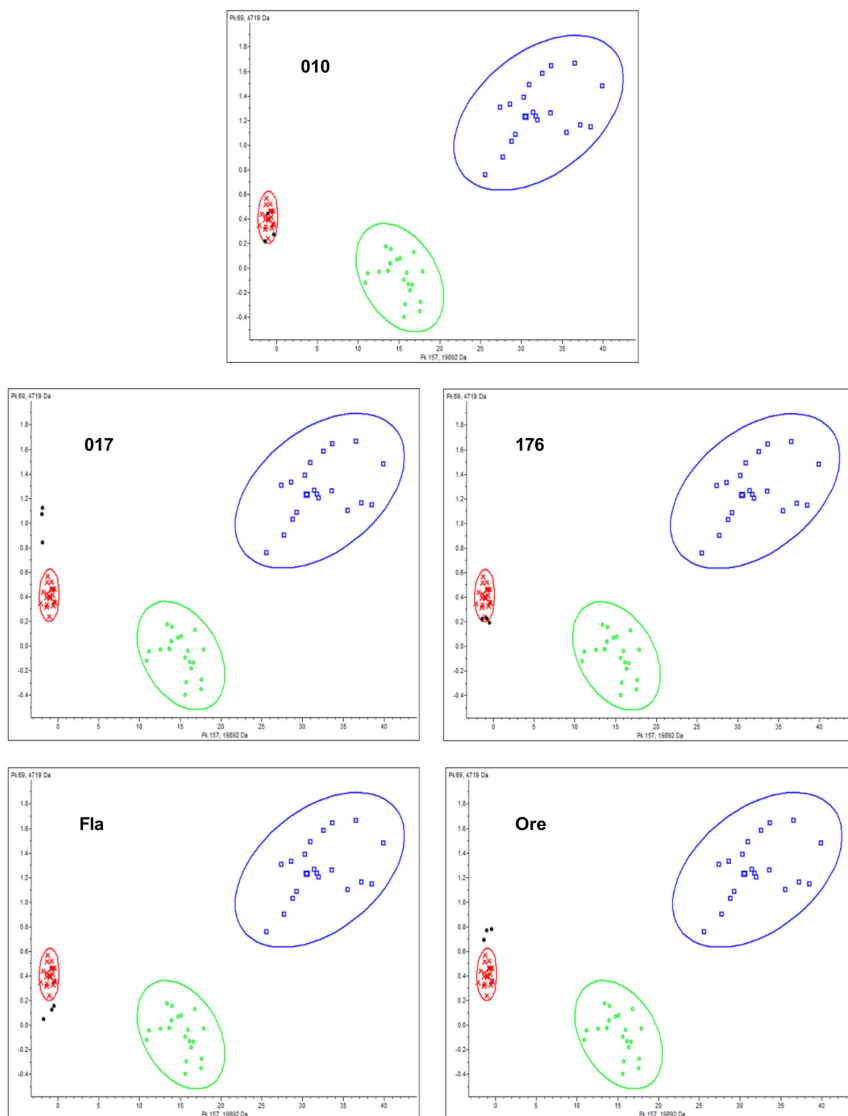


Figura 4. Classificação dos isolados de *Burkholderia mallei* com o programa computacional ClinProTools™. Os gráficos apresentam a distribuição bidimensional dos sinais m/z 4719 e 19892 que, conforme o valor-p estatístico, melhor classificam os isolados clínicos 010, 017, 176, Flash (Fla) e Orelhinha (Ore) de *B. mallei*. Estão apresentados os valores de área dos picos em cada espectro (*B. pseudomallei* 835 em verde, *B. pseudomallei* 2356 em azul e ATCC 15310 de *B. mallei* em vermelho (20 espectros cada), com as elipses representando o intervalo de confiança 95%. Os valores de área dos picos para os isolados clínicos de *B. mallei* (3 espectros cada) estão plotados em preto.

Conclusão

O uso da espectrometria de massas MALDI-TOF possibilitou a identificação de isolados da espécie *Burkholderia mallei* com acurácia de 80%. A identificação de sinais m/z discriminatórios, marcadores das espécies *B. pseudomallei* e *B. mallei*, permitiu alcançar a classificação correta de 100% dos isolados clínicos de *B. mallei* testados neste estudo piloto. A análise de mais amostras de isolados clínicos faz-se necessária para validação da metodologia.

Referências

- ALANI, F.; ALRAWASHDEH, O.; ALI, A.; et al. Glanders in horses: clinical, biochemical and serological studies in Iraq. **Veterinarski Arhiv**, v. 68, p. 155-162, 1998.
- ANGELETTI, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. **J Microbiol Methods**, v. 138, p. 20-29, 2016.
- ARUN, S.; NEUBAUER, H.; GUREL, A.; et al. Equine glanders in Turkey. **The Veterinary Record**, v. 144, p. 255-258, 1999.
- BACANELLI, G.; OLARTE, L.; SILVA, M.; et al. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight mass spectrometry identification of *Mycobacterium bovis* in Bovinae. **J Vet Med Sci**, v. 81, p. 1400-1408, 2019.
- BAZARGANI, T.; TADJBAKHS, H.; BADII, A.; et al. The outbreak of glanders in some racehorses in three states of Iran. **J Equine Vet Sci**, v. 16, p. 232-236, 1996.
- BIER, D.; TUTIJA, J.F.; PASQUATTI, T.N.; et al. Identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isoladas de carcaças bovinas. **Pesq Vet Brasileira**, v. 37, p. 1373-1379, 2017.
- BRASIL. Instrução Normativa N°6, de 16 de janeiro de 2018. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 2018.
- BRUKER DALTONICS. Release Notes, Abril de 2018. Disponível em: <<[>>\[https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=ftp://ftp.bdal.de/data/Support/TOF/MaldiBiotyper/Version8.0.0.0/MaldiBiotyperDBUpdate_V8.0.0.0_7311-7854\\(RUO\\)_Release-Notes.pdf&ved=2ahUKEwj6kZTNm_zsAhXoH7kGHe7pDCUQFjABegQIAhAB&usg=AOvVaw1NMu9xEGAUPI92fICM6bDV\]\(https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=ftp://ftp.bdal.de/data/Support/TOF/MaldiBiotyper/Version8.0.0.0/MaldiBiotyperDBUpdate_V8.0.0.0_7311-7854\(RUO\)_Release-Notes.pdf&ved=2ahUKEwj6kZTNm_zsAhXoH7kGHe7pDCUQFjABegQIAhAB&usg=AOvVaw1NMu9xEGAUPI92fICM6bDV\)>> Acesso em 13 de Nov. 2020.](https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=ftp://ftp.bdal.de/data/Support/TOF/MaldiBiotyper/Version8.0.0.0/MaldiBiotyperDBUpdate_V8.0.0.0_7311-7854(RUO)_Release-Notes.pdf&ved=2ahUKEwj6kZTNm_zsAhXoH7kGHe7pDCUQFjABegQIAhAB&usg=AOvVaw1NMu9xEGAUPI92fICM6bDV)
- CDC-CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Glanders, Transmission. 2012. Disponível em: <<[>><https://www.cdc.gov/glanders/transmission/index.html>>> Acesso em 28 de Fev. 2018.](https://www.cdc.gov/glanders/transmission/index.html)
- CHEN, J.; SHE, K.; WONG, O.; et al. Use of MALDI Biotyper plus ClinProTools mass spectra analysis for correct identification of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis/oralis*. **J Clin Pathol**, v. 68, p. 652-656, 2015.

CLARK, A.; KALETA, E.; ARORA, A.; et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. **Clin Microbiol Rev**, v. 26, p. 547-603, 2013.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, p. 380-407, 2012.

DERBYSHIRE, J.B. The eradication of glanders in Canada. **The Canadian Veterinary Journal La Revue Veterinaire Canadienne**, v. 43, p. 722726, 2002.

DREVINEK, M.; DRESLER, J.; KLIMENTOVA, J.; et al. Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria. **Lett Appl Microbiol**, v. 55, p. 40-46, 2012.

ELSCHNER, M.; KLAUS, C.; LIEBLERTENORIO, E.; et al. *Burkholderia mallei* infection in a horse imported from Brazil. **Equine Vet Education**, v. 21, p. 147-150, 2009.

FREIWALD, A. & SAUER, S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. **Nat Protocols**, v. 4, p. 732-42, 2009.

HORNSTRA, H.; PEARSON, T.; GEORGIA, S.; et al. Molecular epidemiology of glanders, Pakistan. **Emerg Inf Diseases**, v. 15, p. 2036-2039, 2009.

HSUEH, P.; LEE, T.; DU, S.; et al. Bruker biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, and *Listeria* species. **J Clin Microbiol**, v. 52, p. 2371-2379, 2014.

HUANG, C. & HUANG, L. Rapid species- and subspecies-specific level classification and identification of *Lactobacillus casei* group members using MALDI Biotyper combined with ClinProTools. **J Dairy Sci**, v. 101, p. 979-991, 2018.

IAGRO – Mormo. Disponível em www.iagro.ms.gov.br/mormo. Consultado em 09/11/2020.

JANSE, I.; HAMIDJAJA, R. A.; HENDRIKS, A. C.; et al. Multiplex qPCR for reliable detection and differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. **BMC Infect Diseases**, v. 13, p. 86, 2013.

KARGER, A.; STOCK, R.; ZILLER, M. et al. Rapid identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* by intact cell Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation mass spectrometric typing. **BMC Microbiol**, v. 12, p. 229, 2012.

KETTLE, A. N. B.; WERNERY, U. Glanders and the risk for its introduction through the international movement of horses. **Equine Vet J**, v. 48, p. 654-658, 2016.

LASCH, P.; WAHAB, T.; WEIL, S.; et al. Identification of Highly Pathogenic Microorganisms by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Results of an Interlaboratory Ring Trial. **J Clin Microbiol**, v. 53, p. 2632-2640, 2015.

MALIK, P.; KHURANA, S.; SINGH, B.; et al. Recent outbreak of glanders in India. **Indian J Animal Sciences**, v. 79, p. 1015-1017, 2009.

MÄNSSON, V.; RESMAN, F.; KOSTRZEWA, M.; et al. Identification of *Haemophilus influenzae* Type b Isolates by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. **J Clin Microbiol**, v. 53, p. 2215-2224, 2015.

MATSUMURA, Y.; YAMAMOTO, M.; NAGAO, M.; et al. Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clonal groups by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **J Clin Microbiol**, v. 52, p. 1034-1040, 2014.

MOTA, R. A.; BRITO, M. F.; CASTRO, F. J. C.; et al. Mormo em equídeos nos Estados de Pernambuco e Alagoas. **Pesq Vet Brasileira**, v. 20, p.155-159, 2000.

MOTA, R. A.; DA FONSECA OLIVEIRA, A. A.; DA SILVA, A. M.; et al. Glanders in donkeys (*Equus asinus*) in the state of Pernambuco, Brazil: A case report. **Braz J Microbiology**, v. 41, p.146-149, 2010.

NAUREEN, A.; SAQIB, M.; MUHAMMAD, G.; et al. Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders. **J Vet Diag Investigation**, v. 19, p. 362-367, 2007.

ODONTSETSEG, N.; MWEENE, A. S.; KIDA, H. Viral and bacterial diseases in livestock in Mongolia. **Jap J Vet Research**, v. 52, p. 151-162, 2005.

OIE (World Animal Health Organization). Terrestrial Manual. Chapter 2.5.11. Glanders. 2015. Disponível em: <<http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.11_GLANDERS.pdf>> Acesso em 28 de Fev. 2018.

PAL, V.; SAXENA, A.; SINGH, S.; et al. Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Burkholderia mallei*. **Transb Emerg Disease**, v. 65, n. 1, 2018.

PATEL, R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. **Clin Chemistry**, v. 61, p.100-111, 2015.

ROTZ, L. D.; KHAN, A. S.; LILLIBRIDGE, S. R.; et al. Public health assessment of potential biological terrorism agents. **Emerg Infect Diseases**, v. 8, p. 225-230, 2002.

RUDRIK, J. T.; SOEHNLEN, M. K.; PERRY, M. J.; et al. Safety and Accuracy of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Highly Pathogenic Organisms. **J Clin Microbiol**, v. 55, p.3513-3529, 2017.

SAUER, S.; FREIWALD, A.; MAIER, T.; et al. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. **PLoS One**; v. 30, p. e2843, 2008.

SCHOLZ, H. C.; JOSEPH, M.; TOMASO, H.; et al. Detection of the reemerging agent *Burkholderia mallei* in a recent outbreak of glanders in the United Arab Emirates by a newly developed fliPbased polymerase chain reaction assay. **Diag Microbiol Infect Disease**, v. 54, p. 241-247, 2006.

SHARRER, G.T. The great glanders epizootic, 1861-1866: a Civil War legacy. **Agric Hist.**, v. 69, p. 79-97, 1995.

SUTTISUNHAKUL, V.; PUMPUANG, A.; EKCHARIYAWAT, P.; et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Burkholderia pseudomallei* from Asia and Australia and differentiation between *Burkholderia* species. **PLoS One**. v. 12, e0175294, 2017.

TOMASO, H.; SCHOLZ, H. C.; AL DAHOUK, S.; et al. Development of a 5'-nuclease real-time PCR assay targeting *fliP* for the rapid identification of *Burkholderia mallei* in clinical samples. **Clin Chemistry**, v. 52, p. 307-310, 2006.

WAHID, World Animal Health Information Database Interface. 2010.

WERNERY, U.; WERNERY, R.; JOSEPH, M.; et al. Natural *Burkholderia mallei* infection in Dromedary, Bahrain. **Emerg Infect Diseases**, v. 17, p. 1277-1279, 2011.



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL